酮型广藿香MVA途径基因表达分析及与主要成分合成相关性研究

康大力[1]，胡伟明[2]，欧阳蒲月[3,4*]

（1. 宁波卫生职业技术学院，浙江 宁波 315100；2. 中国科学院庐山植物园，江西 九江 510650；3. 广西大学 农学院，南宁 530005；4. 广东食品药品职业学院，广州 510520)

摘 要：广藿香药材以广藿香酮含量较高的酮型广藿香为最优质。而广藿香酮为一种萜类成分，其生物合成途径尚未明确。MVA（甲羟戊酸）途径是萜类化合物生物合成的重要途径。通过实时性定量PCR分析基因表达、主要成分含量测定，其目的是分析两者的相关性从而获得促进广藿香酮合成的潜在基因。该文以2种酮型广藿香栽培品种（石牌广藿香、高要广藿香）为材料，研究了供试材料不同时期的茎、叶中与甲羟戊酸代谢途径相关的*HMGR*、*MK*、*MDD*基因表达及化学成分，分析了基因表达与化学成分间的相关性。结果表明：*HMGR*在石牌广藿香嫩叶中表达更明显； *MK*在石牌广藿香和高要广藿香中表达模式相似，主要在老茎中表达；*MDD*基因在石牌广藿香叶中比高要广藿香表达量更高，在两种广藿香的茎中表达模式相似。同属于酮型广藿香，石牌广藿香与高要广藿香的化学成分相似，老叶广藿香醇含量最高，老茎的广藿香酮含量更高。最后，相关性分析发现*MDD*和*MK*基因与广藿香酮的合成正相关。综上结果所述，酮型广藿香两个栽培种MVA途径的基因表达模式相似，*MDD*和*MK*可能为酮型广藿香萜类代谢途径的关键基因。

关键词：广藿香， MVA途径，广藿香酮，*MDD*基因，*MK*基因

中图分类号：Q943　　　　　　　**文献标识码：** A

Gene expression analysis of MVA pathway in *Pogostemon cablin* and its correlation with synthesis of main components

KANG Dali[1], HU Weiming[2], OUYANG Puyue[3,4*]

(1. *Ningbo College of Health Sciences*, Ningbo 315100, Zhejiang, China; 2. *Lushan Botanical Garden*, *Chinese Academy of Sciences*, Jiujiang 510650, Jiangxi, China; 3. *Agricultural College*, *Guangxi University*, Nanning 530005, China; 4. China *Guangdong Food and Drug Vocational College*, Guangzhou 510520, China)

Abstract: Among all the *Pogostemon cablin* medicinal materials, the pogostone-type one with higher content of pogostone is regarded the best. However, as a terpenoid compound, the biosynthesis of pogostone is still not clear. MVA (cytoplasmic) pathway is an important pathway for terpenoid biosynthesis. Real time quantitative PCR is usually used to analyze gene expression. By clarifying the correlation between chemicals and related gene expression, the potential genes which are key for the synthesis of pogostone can be acquired. In this study, the gene expression of *HMGR*, *MK* and *MDD* of cytoplasmic pathway and the chemical composition in stems and leaves of two pogostone-type *P. cablin* cultivars (Shipai and Gaoyao) were studied, and the correlation between gene expression and chemical composition was analyzed. The results were as follows: *HMGR* was more obviously expressed in the tender leaves of Shipai cultivar. The expression pattern of *MK* in Shipai cultivar and Gaoyao cultivar was similar, and *MK* was mainly expressed in old stems. *MDD* gene was more expressed in

---

基金项目：浙江省医药卫生科技计划项目（2019RC270）；宁波市自然科学基金资助项目（2019A610372）；广东省科技计划项目（2019B030316019）；广东省自然科学基金项目（2018A030313255）[Supported by Medical and Health Science and Technology Planning Project of Zhejiang Province (2019RC270); Ningbo Natural Science Foundation(2019A610372); Science and Technology Planning Project of Guangdong Province(2019B030316019); Guangdong Natural Science Foundation (2018A030313255)]。

作者简介：康大力（1981-），博士，副主任中药师，研究方向为中药药理与中药生物技术，(E-mail) dlkang500@163.com。

[*]**通信作者：**欧阳蒲月，博士，副教授，研究方向为药用植物生物技术，(E-mail)ouyangpy@gdyzy.edu.cn。

Shipai cultivar leaves than that of Gaoyao cultivar, but was expressed in similar patterns in the stems of Shipai cultivar and Gaoyao cultivar. Both belonging to pogostone-type *P. cablin*, Shipai cultivar and Gaoyao cultivar had similar chemical components. Old leaves had the highest patchoulol content and old stems had the highest pogostone content. At last, the correlation analysis showed that *MDD* and *MK* genes were positively related to the synthesis of pogostone, which will lay a foundation for exploring key genes in *P. cablin* terpenoid metabolism pathway. In conclusion, the gene expression patterns of MVA pathway in two *P. cablin* cultivars are similar. *MDD* and *MK* may be the key genes of terpenoid metabolism pathway in *P. cablin*.
Key words: *Pogostemon cablin*, MVA pathway, terpenoids synthesis, *MDD* gene, *MK* gene

广藿香(*Pogostemon cablin*) 为唇形科刺蕊草属植物，以全草入药(国家药典委员会，2020)，为芳香化湿药，是“藿香正气散”、“抗病毒口服液”、“保济丸”等中成药的主要成分，也是香料、化妆品等的主要原料之一。广藿香在新型冠状病毒肺炎诊疗中也发挥了重大作用，在 5 种相关证的治疗方案中有所应用(国家卫生健康委员会和国家中医药管理局，2020)。

广藿香挥发油的主要成分为萜类化合物（陈赫等，2018）。萜类化合物主要通过甲羟戊酸（mevalonate, MVA）途径和甲基赤藓醇 4-磷酸（methylerythritol 4-phosphate, MEP）途径合成（Yu & Utsumi, 2009），其中 MVA 途径也称为细胞质途径，MEP 也称为质体途径（Lichtenthaler, 2015）。通常，MVA 途径产生倍半萜，而 MEP 途径将前体提供给半萜类、单萜类和二萜类成分。萜类合成途径中的多种合成酶是 MVA 和 MEP 途径代谢调控的重要靶点（Hemmerlin, 2012）。在 MVA 途径中，三个乙酰辅酶 A 分子和一个 3-羟基-3-甲基戊二酰-CoA 分子最初聚集，然后中间分子参与由羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶（HMGS，EC 2.3.3.10）、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶（HMGR，EC 1.1.1.34）催化的反应。甲羟戊酸激酶（MVK，EC 2.7.1.36）、磷酸羟戊酸激酶（PMK，EC 2.7.4.2）和甲羟戊酸二磷酸脱羧酶（MDDEC，EC 4.1.1.33）形成 IPP（异戊烯焦磷酸）。随后由法尼基二磷酸合成酶（FPPS，EC 2.5.1.10）催化胞质 IPP 和 DMAPP(二甲基烯丙基焦磷酸)的凝聚，形成倍半萜的中间体（图 1）。

随着转录组测序和全基因组测序的兴起，对广藿香醇的生物合成途径研究逐渐增多。前期研究报道（Nath, 2010）从广藿香转录组文库中发掘到 74 个萜类生物合成相关基因，并检测其在广藿香叶、茎和花中的表达，检测了倍半萜生物合成途径中与广藿香醇合成有关酶的活性。此外，还有研究从广藿香中克隆到了倍半萜 MEP 途径的限速酶 HMGR 的 cDNA，并做了生物信息学分析及在大肠杆菌（*Escherichia coli*）中的表达（Yu & Utsumi, 2009）。

广藿香属于十大岭南特色“广药”，也是“粤八味”之一。由于地理条件的差别，不同产地的广藿香具有不同的形态特征和挥发油含量。广藿香药材商品按产地主要分为石牌广藿香、高要广藿香、湛江广藿香、海南广藿香四种（徐颂军等，2003）。根据广藿香酮和广藿香醇相对含量可将广藿香药材分成醇型广藿香和酮型广藿香。醇型广藿香包括湛江广藿香、海南广藿香；酮型广藿香则包括石牌广藿香、高要广藿香。石牌广藿香原产于广州石牌一带；传统认为，石牌广藿香为广藿香的道地品种，质量最优。但随着城市化的进程，市场上石牌广藿香已十分少见，逐渐被高要广藿香所取代。广藿香酮已被证明具有多种功能，包括抗胃溃疡（Chen et al., 2015）、阻止增殖（Su et al., 2015）和抗菌活性（Yi et al., 2013）等。因此，与醇型广藿香主要应用于化妆品和香料行业不同，酮型广藿香更多被应用于中医药领域。

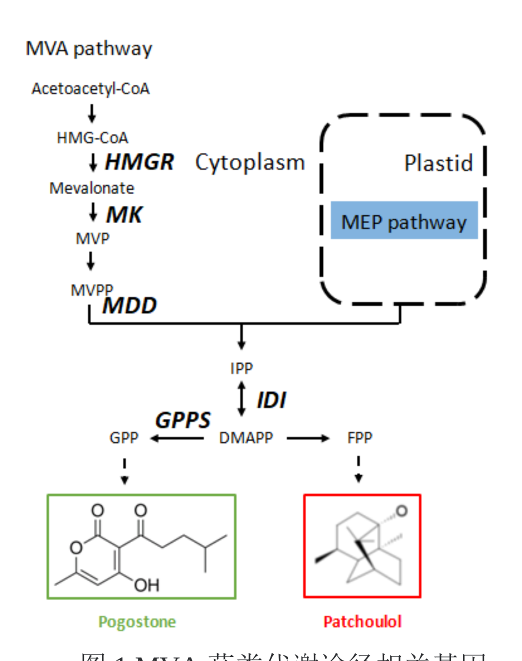


图 1 MVA 萜类代谢途径相关基因

Fig.1 MVA terpenoid backbone pathway-related genes

广藿香酮属于萜类物质衍生物，MVA 是通路萜类物质的上游合成代谢途径，茎和叶是广藿香药材的主要取材组织部位。因此，明确代谢途径基因的时空表达模式，不同生长时期茎叶的有效成分含量以及与基因表达的相关性，对于阐明广藿香酮在高要广藿香和石牌广藿香中的合成途径和提高药材质量是有效利用广藿香的重要前提。作者前期的研究中，已经将两种醇型广藿香（海南和印尼广藿香）进行了萜类代谢途径表达分析（Ouyang et al., 2016）；研究结果显示两种醇型广藿香不同部位不同生长阶段的萜类代谢相关基因表达类似，挖掘了广藿香醇合成相关候选基因，为醇型广藿香的应用提供了基础。目前，在石牌广藿香和高要广藿香的萜类代谢途径及叶、茎部分的表达差异比较方面还是空白。对萜类代谢途径进行表达分析，能够对酮型广藿香和醇型广藿香的差异提供分子基础。同时，将基因表达与成分含量进行相关性分析，可发掘提高有效成分含量的潜在基因。对酮型广藿香两个栽培种的代谢途径及各部位的挥发油含量及成分进行比较，也可促进对广藿香药材种植资源的有效评估。

1 材料与方法

1.1 植物材料

石牌广藿香和高要广藿香采自于广州天河龙洞岭南中药园广藿香种植地（113°22′ E， 23°12′ N，海拔 39 m）。由广东食品药品职业学院莫小路教授鉴定。取两个品种的幼叶进行全长基因的克隆。实时定量 PCR 分析材料：根据叶片的大小及叶在茎上的位置将广藿香的叶和茎分为三个时期（图 2）（Yu et al., 2015）：嫩叶(茎顶端刚出来的第一对叶)；成熟叶(第四至第五个节叶)；老叶；嫩茎(茎顶端)；成熟茎(未木质化)；老茎（木质化）。每个样品采集约 1 g，在液氮中冷冻，在−80 ℃保存。

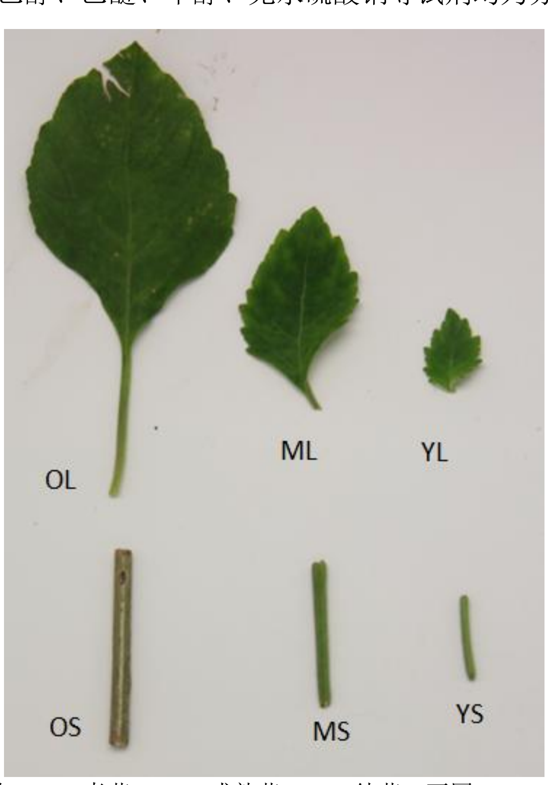
1.2 RNA 提取和 RT-qPCR 分析

按照文献（Ouyang et al., 2016）进行。在对 RNA 的质量和完整性进行检查后，将高质量的 RNA 用于基因分离或基因表达的测定。RT-qPCR 方法如文献所述（Ouyang et al., 2016），每个反应重复三次。RT-qPCR

引物见表 1，数据以三个生物重复的平均值±标准差表示。根据文献（Livak & Schmittgen, 2001）计算基因表达水平。

1.3 化学试剂

广藿香酮对照品（批号：G-055-180710，成都瑞芬思生物科技有限公司）；广藿香醇对照品（批号：B-037-180122，成都瑞芬思生物科技有限公司）；正十八烷(SIGMA 公司)；乙腈色谱纯（德国默克公司）；甲酸（德国默克公司）；无水乙醇、乙醚、甲醇、无水硫酸钠等试剂均为分析纯。



OL. 老叶；**ML**. 成熟叶；**YL**. 幼叶；**OS**. 老茎；**MS**. 成熟茎；**YS**. 幼茎。下同。
OL. Old leaves turning brown and withered; **ML**. Green, fully-expanded and intact mature leaves; **YL**. Tender young leaves on the shoot tip; **OS**. Lignified and brown old stems; **MS**. Slightly-lignified and green mature stems; **YS**. Non-lignified young stems. The same below.

图 2 广藿香实验材料
Fig.2 Plant materials of *Pogostemon cablin*

表 1 RT-qPCR 引物
Table 1 RT-qPCR primer

基因名称 Gene name	实时定量 PCR 引物(5'-3') RT-qPCR primer (5'-3')
HMGR	F: TGTCTCTGATGTCGGCCATA
	R: TCAATGGCGGATCTCTCTCT
MDD	F: GAGTCCACCTCCAGAAACCA
	R: GGGTTGATGAGTGACCGACT
MK	F: ATGAGGTCGCTTCCATCATC
	R: TTTCGATTGTAGCATGGCTG

1.4 仪器设备

Agileng1200 高效液相色谱仪（包括四元梯度泵、自动进样器、PDA 检测器、在线脱气机，美国安捷伦公司）；Agilent7892A/5975C 型气相色谱-质谱联用仪（美国安捷伦公司）；色谱柱为 HP-5 石英毛细管

柱（0.25 μm×30.0 m×250 μm）；BT 125D 十万分之一分析天平（德国赛多利斯）；超纯水为 milli-Q 超纯水机制备（美国 Millipore 公司）；挥发油提取器；水分测定仪。

1.5 广藿香化学成分的分析

1.5.1 挥发油的提取

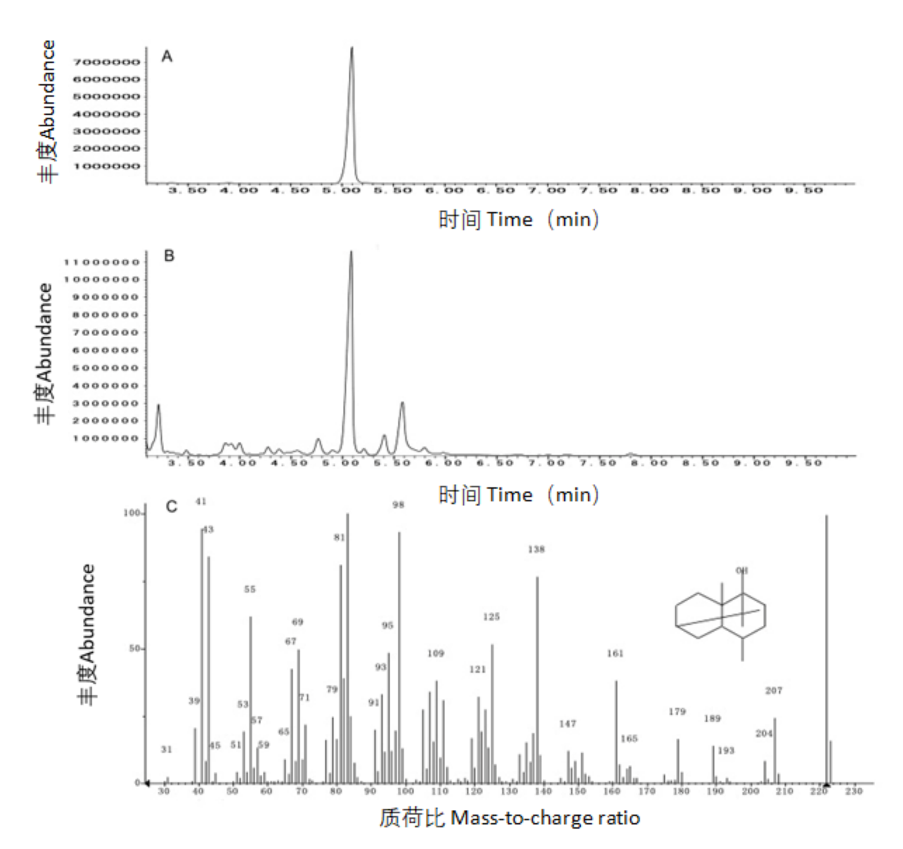
采集石牌广藿香与高要广藿香成熟茎、老茎、成熟叶、老叶（石牌广藿香与高要广藿香的嫩茎及嫩叶挥发油含量太低，无法提取，本研究不进行这两个时期的数据测定）。样品放至通风处室温阴干，切成 1~2 cm 的小段，备用。取干燥的广藿香药材 200 g，置于 5 000 mL 圆底烧瓶中，加 3 000 mL 蒸馏水浸泡 1 h 后开始提取。提取方法见《中国药典》(国家药典委员会，2020)通则 2204 项规定方法（甲法）。

1.5.2 广藿香醇含量测定

对照品溶液及供试品溶液的制备：均按文献（陈瑜珍等，2020）进行。气相色谱条件：初始温度 180 ℃，停留 2 min，以每 5℃的速率升温至 230 ℃；进样口温度 280 ℃，辅助温度 280 ℃，分流进样，分流比为 10：1。离子源温度为 230 ℃，四级杆温度 150 ℃，全扫描方式，NIST14.1 质谱库挥发油中广藿香醇 GC-MS 分析(图 3)。

1.5.3 广藿香酮含量测定

对照品溶液、供试品溶液制备：均按文献（陈瑜珍等，2020）进行。色谱条件　色谱柱：Phenomenex，Gemini 5 μC18（250mm ×4.60 mm）。流动相：乙腈-0.2%甲酸水溶液（65%：35%），等度洗脱，流速 0.8 μg·min^{-1}，柱温 30 ℃，检测波长 310 nm，进样体积 10 μL。运行时间 15 min，色谱图见图 4。线性关系考察　按照色谱条件，精密吸取不同浓度广藿香酮标准品溶液 10 μL，注入 HPLC 色谱仪，检测峰面积，以进样浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归（图 5），回归方程：Y=18.35X-47.19，R^2=0.999 9，线性范围为 6.25~200 μg·mL^{-1}。稳定性试验　取配制好的供试品溶液任一种，制备后在不同时间对样品按色谱条件进样分析，共分析 6 次（制备后 2、4、6、8、12、24 h），测定广藿香酮峰面积，结果 RSD 为 1.05%，表明供试品溶液在 24 h 内是稳定的。精密度实验　取 50 μg·mL^{-1} 对照品溶液，按色谱条件测定，连续进样 6 次，测定峰面积，广藿香酮峰面积的 RSD 为 0.63%，表明高效液相色谱这套仪器的精密度良好，实验数据可信。重复性试验　取同一批广藿香油 6 份，每份 0.15 g，精密称定，按照步骤 2 方法配制后，按色谱条件测定。结果，样品中广藿香酮峰面积 RSD 为 0.86%，表明该方法的重复性良好。数据分析方法　挥发油含量分析均使用 LSD 法进行多重比较。R3.6 软件以及 agricolae 包进行统计分析。

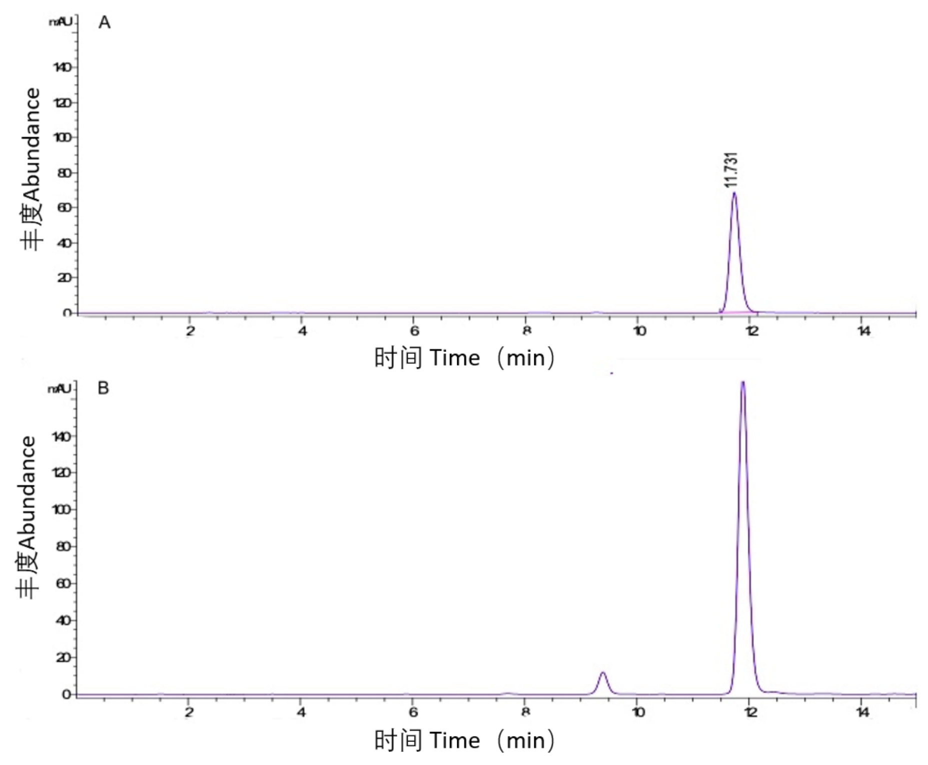


A. 广藿香醇标准品总离子色谱图；**B**. 广藿香醇挥发油总离子色谱图；**C**. 广藿香醇质谱图。

A. Total ion chromatogram of *P. cablin* patchoulol standard; **B**. Total ion chromatogram of *P. cablin* essential oil; **C**. Mass spectrometry of *P. cablin* patchoulol.

图 3 挥发油中广藿香醇的 GC-MS 分析

Fig.3 GC-MS analysis of patchoulol in *Pogostemon cablin* essential oil



A. 广藿香酮标准品的 HPLC 色谱图; **B**. 广藿香酮挥发油的 HPLC 色谱图。

A. HPLC chromatogram of *P. cablin* pogostone standard; **B**. HPLC chromatogram of *P. cablin* essential oil.

图 4 广藿香挥发油中广藿香酮的 HPLC 分析

Fig.4 HPLC analysis of pogostone in *Pogostemon ablin* essential oil

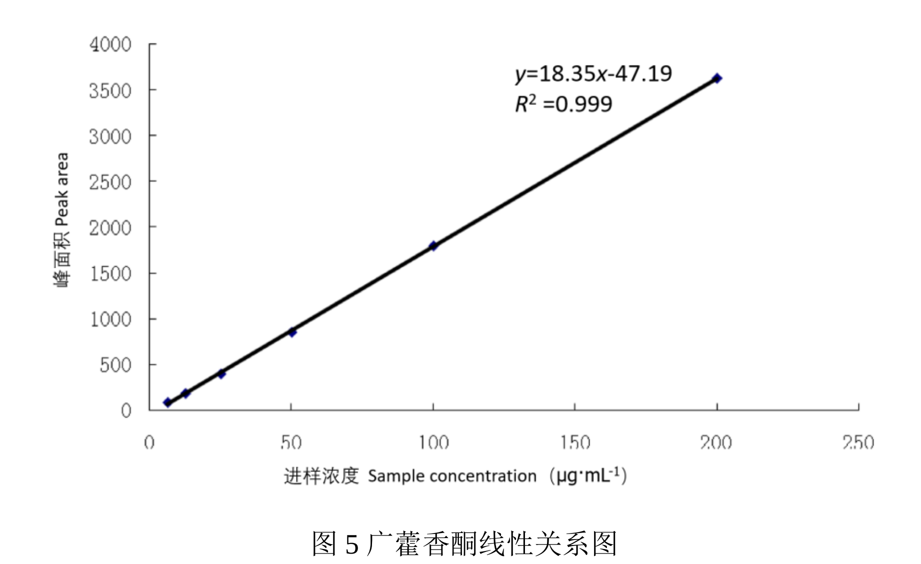


图 5 广藿香酮线性关系图

Fig.5 Linear relation diagram of pogostone in *Pogostemon cablin*

2 结果与分析

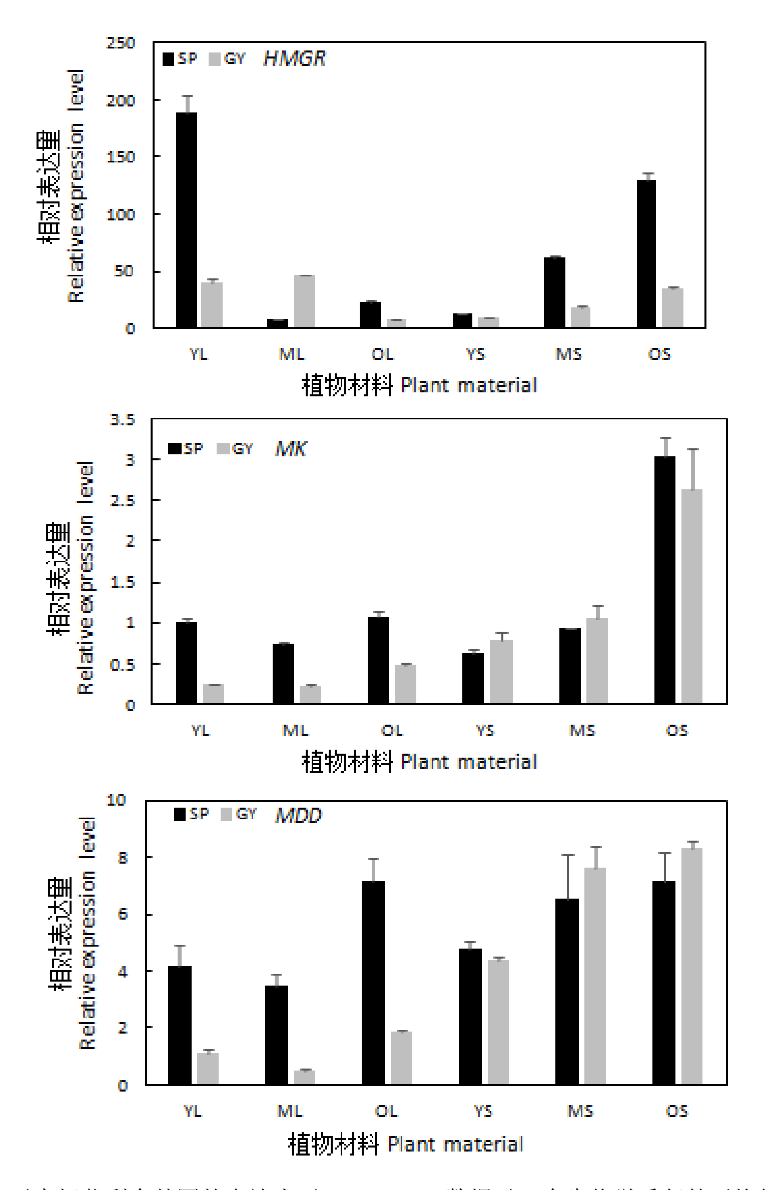
2.1 酮型广藿香萜类代谢 MVA 途径中 *HGMR*、*MK*、*MDD* 基因在茎叶不同时期的表达

为了比较石牌广藿香和高要广藿香次生代谢相关基因的时空表达模式，本研究对MVA途径中三个关键酶基因：*HGMR*、*MK*、*MDD*在叶片和茎中的表达量进行了检测（图6)。结果表明，在石牌广藿香叶片生长发育过程中，*HGMR*、*MDD*、*MK*表达下降，但当叶片衰老后，表达则又出现增高。茎发育过程中，*HMGR*、*MDD*、*MK*表达均呈增高趋势，在老茎中表达最高。在高要广藿香中，发现了相似的基因表达模式。唯有*HGMR*在叶中表达趋势与石牌广藿香不同，其在成熟叶片中高表达，幼叶次之，老叶最低（图6)。

2.2 广藿香醇和广藿香酮的含量与相关基因表达的关系

为了进一步确定广藿香在药材商品中最佳的药用部位，本研究测定了酮型广藿香在成熟茎、老茎、成熟叶、老叶四个部位的广藿香醇和广藿香酮的含量。结果表明：石牌广藿香的老茎广藿香酮含量最高，为301 $\mu g \cdot g^{-1}$，而成熟茎为233 $\mu g \cdot g^{-1}$。而高要广藿香的老茎和成熟茎中广藿香酮的含量差异不大，老茎242 $\mu g \cdot g^{-1}$，成熟茎239 $\mu g \cdot g^{-1}$（图7）。石牌广藿香和高要广藿香嫩茎和嫩叶挥发油含量过低，本研究未对其进行测定。同样地，广藿香醇在老茎和成熟茎的挥发油太少，也未能检测到其含量。两种酮型广藿香的广藿香醇含量，老叶均比成熟叶高一点，其中石牌广藿香的老叶广藿香醇的含量为559 $\mu g \cdot g^{-1}$，成熟叶为403 $\mu g \cdot g^{-1}$；高要广藿香的老叶广藿香醇的含量为445 $\mu g \cdot g^{-1}$，成熟叶为415 $\mu g \cdot g^{-1}$。

为了进一步评价基因与植物化学物质之间的关系，使用 XLSTAT 将不同部位与采收时期广藿香醇和广藿香酮的含量和相对应基因的表达水平进行相关性分析，估计 Pearson 相关系数。结果表明，*MK* (R^2=0.758, P<0.05)、*MDD* (R^2=0.758, P<0.05)的表达加速了广藿香酮的积累。



以 *MK* 在幼叶中的表达水平来规范剩余基因的表达水平；RT-qPCR 数据以三个生物学重复的平均值±标准差表示。**SP**. 石牌广藿香；**GY**. 高要广藿香。下同。

The expression level of *MK* in young leaves was used to normalize the expression level of remaining genes；The RT-qPCR data were presented as mean ±SD of three biological replicates. **SP**. Shipai cultivar; **GY**. Gaoyao cultivar. The same below.

图6 *HGMR*、*MK*、*MDD*基因的时空表达模式

Fig.6 Spatiotemporal expression pattern of *HMGR*, *MK* and *MDD* genes

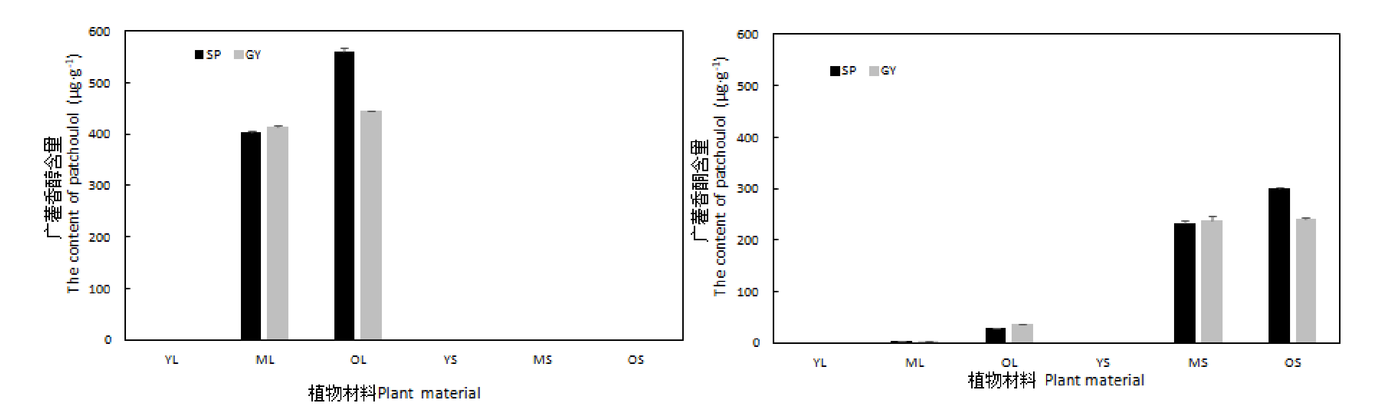


图 7 石牌广藿香和高要广藿香栽培种广藿香醇和广藿香酮的含量

Fig.7 Contents of patchoulol and pogostone in SP and GY cultivars

3 讨论与结论

广藿香药材的道地品种属于酮型广藿香如高要广藿香，而石牌广藿香在市场上却因为产量低而少见。qPCR 被认为是检测 RNA 水平最灵敏、高效快捷的方法，它常用于单个或多个基因的表达分析。本研究分析结果显示，MVA 途径 3 个基因的表达模式在石牌和高要两个栽培种间高度相似。在遗传学中，基因表达是以环境依赖方式连接基因型和表型的基本因素（Nevozhay et al., 2012）。这可能从分子水平上解释了为什么高要广藿香和石牌广藿香同属一个化学型，为市场上用高要广藿香代替石牌广藿香提供了的理论支持。石牌广藿香在宋代就从印度尼西亚传入，并移植到广东省的高要等地区。目前，广藿香的种植主要是靠扦插繁殖和组织培养。因此，酮型广藿香的基因变异和物种分化有限，不利于物种变异（徐颂军等，2003；吴友根等，2007）。这可能是高要广藿香的 MVA 途径基因表达模式与石牌广藿香相似的原因。

植物中萜类化合物的产生和积累具有组织特异性特点，它们的增加与发育阶段有关（Gershenzon, 2000; Yu et al., 2015）。本研究发现，在石牌广藿香和高要广藿香两个品种叶片的三个发育阶段广藿香酮含量都非常低，而在两个品种的衰老茎中，广藿香酮含量增加。因此，广藿香酮的生物合成也具有组织特异性和生长周期依赖性，在种植酮型广藿香时，茎应受到更多的关注。

从广藿香药材质量优良评价来看，广藿香酮含量是广藿香质量的重要指标。本研究发现 *MK*、*MDD* 基因可能是影响广藿香中广藿香酮含量的重要基因，为通过代谢工程转基因方法提高广藿香中广藿香酮的含量提供了研究思路。此外，二者在广藿香酮生物合成中的作用还需要进一步通过转基因等分子生物学和代谢工程手段验证。

人们普遍认为，道地药材是药用植物长期适应环境的结果，遗传因素可能是道地药材与非道地药材化学成分差异显著的根本原因。本研究结果发现，高要广藿香和石牌广藿香的 *MK* 和 *MDD* 基因表达模式相似，在石牌广藿香和高要广藿香中广藿香酮的含量均较高，表明高要广藿香能够代替石牌广藿香是具有合理性的。MVA 途径的 *MK* 和 *MDD* 基因与广藿香酮合成正相关，本研究结果阐明了广藿香的基因表达和化学成分相关性，将有助于萜类产物生物合成的提高，为更好地利用广藿香奠定了基础。

参考文献：

CHEN HM, LIAO HJ, LIU YH, et al., 2015. Protective effects of pogostone from Pogostemonis Herba against ethanol-induced gastric ulcer in rats [J]. Fitoterapia, 100: 110-117.

CHEN H, WU YG, YANG YZ, et al., 2018. Transcriptome data assembly and gene function annotation of young and mature leaves of *Pogostemon cablin* Benth [J]. Mol Plant Breed, 16(7): 2139-2154. [陈赫，吴友根，杨豫章，等，2018. 广藿香幼叶与成熟叶片转录组数据组装及基因功能注释 [J]. 分子植物育种, 16(7): 2139-2154.]

CHEN YZ, JIAO HY, ZHU BR, et al., 2020. Investigation of *Pogostemon cablin* Benth through analysis the volatile components in herbs grown in different area of Guangdong [J]. Strait Pharmaceutical J, 32(2): 32-35. [陈瑜珍，焦豪妍，朱槟如，等，2020. 广东各地广藿香挥发油质量分析与研究 [J]. 海峡药学, 32(2): 32-35.]

CHINESE PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2020. Chinese Pharmacopoeia [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press.[国家药典委员会, 2020. 中华人民共和国药典 [M]. 北京:中国医药科技出

版社.]
GERSHENZON J, 2000. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint [J]. Plant Physiol, 122(1): 205-214.
HEMMERLIN A, HARWOOD JL, BACH TJ, 2012. A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? [J]. Progr Lipid Res, 51(2): 95-148.
LICHTENTHALER HK, 2015. The 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants [J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 50(1): 47-65.
LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method [J]. Methods, 25(4): 402-408.
NATH AM, 2010. Expression and function analysis of *HMGR*, *DXS* and *DXR* genes in *Amomum villosum* Lour. [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine. [Adhikari Megha Nath, 2010. 阳春砂 *HMGR*，*DXS* 和 *DXR* 基因表达及功能分析 [D]. 广州：广州中医药大学.]
NATIONAL HEALTH COMMISSION, NATIONAL ADMINISTRATION OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE, 2020. Diagnosis and treatment plan for COVID-19 (the 7th Tentative Version) [EB/OL]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-03/04/content_5486705.htm. [国家卫生健康委员会，国家中医药管理局，2020. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第七版）[EB/OL]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-03/04/content_5486705.htm.]
NEVOZHAY D, ADAMS RM, VAN ITALLIE E, et al., 2012. Mapping the environmental fitness landscape of a synthetic gene circuit [J]. PLoS Comput Biol, 8: e1002480.
OUYANG PY, LIU YL, WANG Y, et al., 2016. Aging and/or tissue-specific regulation of patchoulol and pogostone in two *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. cultivars [J]. Physiol Plantarum, 158(3): 272-283.
SU JY, LUO X, ZHANG XJ, et al., 2015. Immunosuppressive activity of pogostone on T cells: Blocking proliferation via S phase arrest [J]. Int Immunopharmacol, 26(2): 328-337.
WU YG, GUO QS, ZHENG HQ, 2007. Textual research on history of introduction and herbal medicine of *Pogostemon cablin* [J]. Chin J Chin Mat Med, 32(20): 2114-2117. [吴友根，郭巧生，郑焕强，2007. 广藿香本草及引种历史考证的研究 [J]. 中国中药杂志, 32(20): 2114-2117.]
XU SJ, WANG XF, XU XH, et al., 2003. Discussion on the species classification of medicinal plant patchouli [J]. J S Chin Norm Univ (Nat Sci Ed), 2(1): 82-86. [徐颂军，王晓峰，徐祥浩，等，2003. 药用植物广藿香的品种分类探讨 [J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2(1): 82-86.]
YI YY, HE JJ, SU JQ, et al., 2013. Synthesis and antimicrobial evaluation of pogostone and its analogues [J]. Fitoterapia, 84: 135-139.
YU FN, UTSUMI R, 2009. Diversity, regulation, and genetic manipulation of plant mono- and sesquiterpenoid biosynthesis [J]. Cell Mol Life Sci, 66(18): 3043-3052.
YU ZX, WANG LJ, ZHAO B, et al., 2015. Progressive regulation of sesquiterpene biosynthesis in *Arabidopsis* and patchouli (*Pogostemon cablin*) by the miR156-targeted SPL transcription factors [J]. Mol Plant, 8(1): 98-110.